Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Marburg
Geschf. Direktor: Professor Dr. med. H. Kaffarnik

ERYTHROZYTENMEMBRANPHOSPHOLIPIDE BEI PATIENTEN MIT ZIEVE-SYNDROM UND NACH INTRAVENÖSER GABE VON " HOCHUNGESÄTTIGTEN PHOSPHOLIPIDEN "

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

ANGELIKA LORRA
aus Gelsenkirchen

Marburg 1978

1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Marburg
Geschf. Direktor: Professor Dr. med. H. Kaffarnik

ERYTHROZYTENMEMBRANPHOSPHOLIPIDE BEI PATIENTEN MIT ZIEVE-SYNDROM UND NACH INTRAVENÖSER GABE VON " HOCHUNGESÄTTIGTEN PHOSPHOLIPIDEN "

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

ANGELIKA LORRA

aus Gelsenkirchen

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am .20.4.79...
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. F. Neurath
Referent: Dr. med. J. Schneider
Correferent: Prof. Dr. H. Kaffarnik

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung 1

B. Methodik 8

1. Patienten
2. Isolierung von Erythrozyten 9
3. Isolierung von Erythrozytenmembranen 10
4. Lipidextraktion 11
5. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie zur Auftrennung der einzelnen Phospholipide 12

a) Herstellung der Platten
b) Auftragen der Proben
c) Entwicklung des Chromatogramms
d) Abnahme der einzelnen Phospholipide von der Platte
e) Bestimmung des Phosphorgehalts der einzelnen Komponenten
f) Identifizierung der Einzelfraktionen

6. Auswertung und Statistik 29

C. Ergebnisse 32

D. Diskussion 41

E. Zusammenfassung 43

Literaturverzeichnis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0059

A. Einleitung

Von dem gesamten Lipidgehalt eines roten Blutkörperchens entfallen über 90 % auf die Zellmembran. Besonders wichtig ist die Bedeutung der Phospholipide beim Aufbau der Blutzellen. Die Struktur der roten Zellen, abnormale Zusammensetzung der Erythrozyten und Leukozyten, ist eng mit den Phospholipiden verbunden (22). Um einen Überblick über die Anordnung der Erythrozytenmembranbausteine zu geben, ist hier ein Membranmodell eines menschlichen Erythrozyten (Abb.1) abgebildet (1).

Die 50 - 120 Å dicke Erythrozytenmembran besteht aus Cholesterin, Lipoproteinen und Glycoproteinen. Hämoglobin ist am Aufbau der Membran nicht beteiligt. Der Lipidanteil an der Gesamterythrozytenmasse beträgt nur 0,5 %. Zum überwiegenden Teil handelt es sich dabei um Phospholipide und Cholesterin. 95 % dieser Lipide befinden sich in der Erythrozytenhülle.

Die in der Membran enthaltenen Proteine dienen hauptsächlich als Träger für die Lipide und Mucopolysaccharide.

Die Erythrozytenmembran besteht aus mehreren Schichten. Die mittlere Membranschicht besteht aus Cholesterin und polar angeordneten Phospholipidmolekülen, deren hydrophile Gruppen nach außen und deren hydrophobe Gruppen nach innen gerichtet sind. Innen und außen wird diese Mittelschicht von einer Proteinschicht überzogen. Ganz außen befindet sich eine Mucopolysaccharidschicht (4).

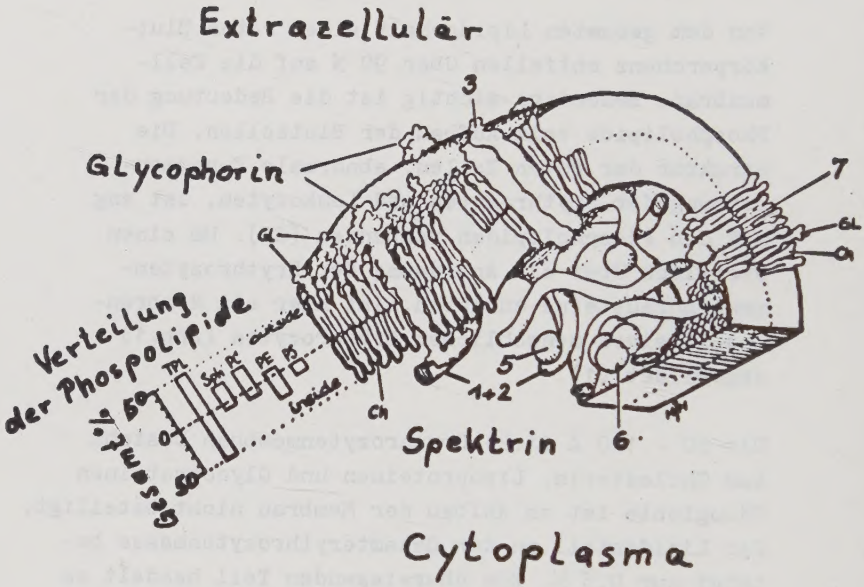


Abb. 1

TPL	:	Gesamtphospholipide
Sph	:	Sphingomyelin
PC	:	Phosphatidylcholin
PE	:	Phosphatidyläthanolamin
PS	:	Phosphatidylserin
Gl	:	Glykolipide
Ch	:	Cholesterin
Proteine	:	
1+2		Spektrin
3		Protein Glycophorin (ein Sialoglycoprotein)
5		Erythrozyten Actin
6		Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
7		Protein

Die Stabilität der Membran hängt zum größten Teil von den in ihr enthaltenen Phospholipiden und dem Cholesterin ab. Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylinosit und Phosphatidylserin spielen dabei eine geringere Rolle als das Sphingomyelin. Man kann also sagen, daß Cholesterin und Sphingomyelin hauptsächlich verantwortlich sind für die Stabilität einer Membran (8).

Zum Studium für die Veränderung der Phospholipide in vivo durch Lipidveränderungen im Plasma wurden in dieser Untersuchung zwei Modelle ausgewählt: 1) Die Verhältnisse bei Zieve-Syndrom, wegen möglicher Beteiligung der Membranphospholipide an der Hämolyse; 2) Die Veränderung durch i.v. Gabe von Phospholipiden mit bekannter Zusammensetzung.

Zu 1):
Infolge des ständig gestiegenen Alkoholkonsums ist im größeren Umfang mit Schädigungen der Leber durch Alkohol zu rechnen. Insbesondere der chronische Genuß von Alkohol führt direkt und indirekt zu Schädigungen des Organismus, wobei die Wirkung auf Gehirn, periphere Nerven, Lunge, Herz und Gastrointestinaltrakt hier nur kurz zu erwähnen ist (20).

Eine direkte Wirkung des jahrelangen Alkoholgenusses greift an der Leber an. Das von Z I E V E (29) 1958 erstmals veröffentlichte und seither nach ihm benannte Krankheitsbild ist dadurch charakterisiert, daß ätiologisch ein chronischer Alkoholabusus vor-

liegt. Als kritische Dosis erweisen sich 160 g reiner Alkohol pro Tag, die kritische Dauer des Abusus liegt bei über 10 Jahren (27).

Das Zieve-Syndrom findet man vorwiegend bei Männern mit chronischem Alkoholgenuß; es weist als Hauptsymptome eine Hyperlipoproteinämie, hämolytische Anämie und Ikterus auf. Es ist bis jetzt noch unklar, warum sich nur bei einem geringen Teil der Alkoholiker ein Zieve-Syndrom entwickelt (18).

Das Erkennen dieser oft bedrohlich erscheinenden Erkrankung ist im Hinblick auf die Differentialdiagnose und den sich daraus ergebenden therapeutischen Konsequenzen von wesentlicher Bedeutung. Die Schwierigkeiten der Diagnose liegen in dem passageren Charakter der Symptome begründet, da sie unter Alkoholkarenz schnell reversibel sind. Die Patienten klagen meistens über Inappetenz, Übelkeit, Erbrechen, Oberbauchbeschwerden und Diarrhoe.

Die Hyperlipämie ist bei der Mehrzahl der Patienten mit Zieve-Syndrom schon bei der ersten Blutentnahme an einem rahmigen Serum zu erkennen. Die Ursache für die Hyperlipämie scheint in einer gesteigerten Fettgewebslipolyse in der Peripherie und vermindertem Abbau von Chylomikronen zu liegen. Bei der Untersuchung der Serumlipide sind massiv die Triglyceride und gering das Cholesterin erhöht.

Die hämolytische Anämie mit Verkürzung der Erythrozytenlebenszeit kann bedrohliche Ausmaße annehmen. Im Sternalpunktat findet man die sogenannten Schaumzellen (lipoidspeichernde Retikulumzellen).

Es wurde eine intrazelluläre Stoffwechselstörung der Erythrozyten mit Beteiligung einer vermehrten Destruktion der roten Zellen festgestellt (15). Außerdem wurde die mutmaßliche Rolle des Erythrozytenstoffwechsels im Zusammenhang mit membranverbundenen oder äußeren Faktoren bei Patienten mit Hämolyse bei Zieve-Syndrom näher bestimmt (16).

Als letztes Symptom sei noch der Ikterus erwähnt, der trotz Hämolyse labormäßig vor allem ein erhöhtes d i r e k t e s Bilirubin zeigt und den häufigsten Grund zur stationären Aufnahme der Patienten darstellt. Eine Leberschädigung ist beim Zieve-Syndrom immer nachweisbar. Meist besteht eine Steatosis hepatis graduell verschiedener Ausprägung (2).

Die schädigenden Einflüsse des Alkohols auf das Blut stehen etwas im Schatten der bekannten Einwirkungen auf Leber und Nervensystem. Schwerer Alkoholmißbrauch, vor allem die akute Alkoholintoxikation bei chronischen Alkoholikern, führt zu quantitativen und qualitativen Veränderungen aller drei hämopoietischen Systeme. Neben einem über verschiedene Mechanismen möglichen hämolytischen Effekt auf die roten Zellen, funktionellen Störungen der Granulozyten und Immunozyten und qualitativen Abnormitäten der Thrombozyten ist für alle drei Zellreihen auch ein wahrscheinlich direkt toxischer Effekt auf die Zellproduktion nachgewiesen worden (26).

Es ist möglich, daß Erythrozytenlipide, die als Membrankomponenten im Austausch mit Plasmaphospholipiden stehen, einen Faktor in der Pathogenese der Hämolyse bei Zieve-Syndrom darstellen könnten (16). Veränderungen im Phospholipidmuster sind in Erythrozyten von Patienten mit chronischem Leberschaden ohne Zieve-Syndrom gefunden worden (7).

Nachdem eine sicher reproduzierbare Fraktionierung auch kleiner Mengen von Phospholipiden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie möglich geworden ist, liegt es nahe, bei alkoholischen Lebererkrankungen mit Hämolyse nach charakteristischen Veränderungen des Phospholipidmusters der Erythrozyten zu suchen. Deshalb bestand das Ziel dieser Arbeit darin, Erythrozytenmembranphospholipide (Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinosit, Sphingomyelin) bei Leber- und Stoffwechselgesunden im Alter von 24 - 83 Jahren (9 männliche und 11 weibliche Probanden) und bei 20 Zieve-Syndrom-Patienten im Alter von 30 - 70 Jahren (alle männlich) durchgeführt. Es wurden die einzelnen Phospholipidfraktionen der Erythrozytenmembranen bestimmt.

Zu 2):
Des weiteren bestand die Aufgabe darin, die einzelnen Phospholipidfraktionen in Erythrozytenmembranen bei 20 Leber-und Stoffwechselgesunden, einmal vor i.v. Gabe von hochungesättigten oder "essentiellen" Phospholipiden (EPL) und nach i.v. Gabe zu verfolgen, ob und falls, wie die Membranphospholipide sich ändern. Die i.v. Gabe von Phospholipiden ist in der Therapie der Fettembolie ein anerkanntes Therapieprinzip. Diese wirken als

Emulgatoren auf die Kapillaren und senken die Viskosität, eventuell auch über die Veränderung der Erythrozytenflexibilität, die von dem Membranaufbau maßgeblich abhängt. Insofern war es interessant Nachforschungen anzustellen, inwieweit sich die Phospholipide der Erythrozytenmembran bei Stoffwechselgesunden unter Gabe von EPL verändern.

B. Methodik

1. Patienten

Die Untersuchten sind 20 Zieve-Syndrom-Patienten im Intervall im Alter von 30 - 70 Jahren (alle männlich). Sie bilden bei der Untersuchung die Gruppe "Zieve".

Als Vergleichsgruppe "Gesunde" wurden 20 Stoffwechslgesunde und Lebergesunde Probanden ausgewählt. Sie waren im Alter von 24 - 83 Jahren (11 weiblich, 9 männlich).

Eine dritte Gruppe bilden 10 Stoffwechselgesunde im Alter von 24 -28 Jahren, die wir weiterhin in den Abbildungen die "Jungen" nennen.

Die vierte Gruppe sind 10 Stoffwechselgesunde im Alter von 61 - 83 Jahren, die wir in den Abbildungen die "Alten" nennen.

Die Gruppen 5 und 6 sind die Gruppen 3 und 4 nach i.v. Gabe von "EPL" (250 mg EPL-Substanz, Fa. Nattermann), die im weiteren Text als "Junge nach EPL" und "Alte nach EPL" bezeichnet werden.

2. Isolierung von Erythrozyten

Die Methode zur Erythrozytenisolierung mit Baumwolle nach BUSCH und PELZ (6) erweist sich hinsichtlich der Eliminationsrate der Leukozyten und Thrombozyten als optimal. Man findet pro 10^4 Erythrozyten nur 0,2 bis 0,3 Leukozyten und unter 50 Thrombozyten.

Durchführung der Isolierung von Erythrozyten

Eine kleine Glassäule (Ø = 12 mm) wird mit etwas 2,6 g sterilisiertem Baumwollfaden nicht zu fest gestopft. Die Füllhöhe beträgt etwa 1/3 bis 1/2 der Gesamthöhe der Säule. Diese Baumwolle wird 5 mal mit physiologischer NaCl-Lsg. gewaschen, da ansonsten die Gefahr einer Hämolyse besteht. 20 ml ACD-Blut (18 ml Vollblut und 2 ml ACD) werden auf die Säule gegeben und es wird mit physiologischer NaCl-Lsg. solange nachgespült, bis die Baumwolle wieder fast hell ist. Das filtrierte Blut wird in 10 bis 12 Zentrifugengläsern aufgefangen und 10 Minuten bei 1500 prm zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich Serum und NaCl-Lsg. befinden, wird mit Hilfe einer Pasteurpipette, angeschlossen an einer Wasserstrahlpumpe, abgesaugt. Das Sediment wird in dem Zentrifugenröhrchen leicht aufgeschüttelt und nochmals zentrifugiert. Dieser Vorgang wird mindestens 3 mal wiederholt, bis der Überstand vollkommen klar ist. Der Überstand wird wieder abgesaugt und die Sedimente zusammengeschüttet. Dieses Sediment enthält jetzt überwiegend Erythrozyten bis auf die vorher schon angegebenen Mengen an Leukozyten und Thrombozyten.

3. Isolierung von Erythrozytenmembranen

Herstellung der Reagentien

Digitonin-Lsg.: 1 g Digitonin ad 100 ml Aqua bidest
= gesättigte Lösung
(Digitonin, M.G. 1229, 34 C 56,
H 92, Firma Merck)

TRA-Puffer : pH 7,5; 0,1 M
18,57 g TRAP (Triäthanolamin-Hydrochlorid Uris. MG. 185; 7; 15325/ Firma Böehringer) einwiegen und in 900 ml Aqua bidest lösen. 2,00 g EDTA (Idranal III-Dinatriumsalz; Fa. Riedel) in die Lösung geben, mit NaOH auf pH 7,5 bringen und auf 1000 ml mit Aqua bidest auffüllen.

Durchführung

Die Erythrozytenmembranen werden nach der Methode von DODGE, MITCHEL und HANAHAN (12) isoliert. Die aus dem vorhergehendem Versuchsschritt erhaltenen Erythrozyten werden mit physiologischer NaCl-Lsg. im Verhältnis 1:3 verdünnt, so daß eine Suspension entsteht. Die gesamte Suspension wird auf 10 Zentrifugenröhrchen aufgeteilt.

Pro 1 ml Erythrozyten-Suspension werden hinzugefügt:

0,2 ml gesättigte Digitonin-Lsg.
0,8 ml Aqua bidest
1,0 ml TRA-Puffer

Die Gläser werden mit Parafilm verschlossen, vorsichtig gemischt und 30 min. im Kühlschrank inkubiert, danach zentrifugiert man 10 min. bei 3000 rpm. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert und das Sediment, welches nur noch aus Erythrozytenmembranen besteht, in einem Röhrchen zusammengeschüttet.

Die Membranen können durch Einfrieren mehrere Wochen erhalten bleiben.

4. Lipidextraktion

Die Herstellung eines Lipidextraktes aus Erythrozytenmembranen erfolgt mit Hilfe des Verfahrens von FOLCH (14) und SPERRY (24). 57 ml $CHCl_3$:CH_3OH (2:1)-Gemisch werden in einem 150 ml Rundkolben auf 50°C erhitzt.

3 ml Erythrozytenmembranen werden unter Schütteln tropfenweise hinzugegeben; danach erfolgt unter weiterem Schütteln Erhitzung auf 70°C für 1 min. Das Gemisch wird filtriert und die Menge des Filtrats gemessen. Das Filtrat wird in einen Scheidetrichter gegeben und 1/5 des Volumens an 0,58 %iger NaCl-Lsg. dazugegeben. Nach kräftigem Schütteln (ca. 10 min.) stellt man den Scheidetrichter über Nacht (ca. 16 Std.) in den Kühlschrank, damit sich zwei Phasen bilden können.

Die obere wässrige Phase, die einen Großteil des Methanols aufgenommen hat, wird verworfen. Die untere Chloroformphase, in der die Lipide enthalten sind, wird in einen Rundkolben gegeben und bei 36°C am Rotationsverdampfer eingeengt. Die eingedampfte Substanz wird nochmals in wenigen Milli-

litern $CHCl_3$:CH_3OH (2:1) gelöst und in einem vorher gewogenen kleinen Spitzkolben überführt. Außerdem wird der Rundkolben noch dreimal mit je 1 ml $CHCl_3$: CH_3OH (2:1) ausgespült. Diese Mengen werden ebenfalls in den Spitzkolben pipettiert. Der Inhalt des Spitzkölbchens wird wiederum bei 36°C am Rotationsverdampfer eingedampft. Anschließend wird das Kölbchen mit Stickstoff belüftet. Danach legt man den Spitzkolben in einen an eine Ölpumpe angeschlossenen Exsikkator, in dem ein Töpfchen mit rauchender Schwefelsäure und ein Töpfchen mit $CaCl_2$-Plättchen steht und läßt die Substanz etwa eine 1/2 Std. trocknen.
Das Vakuum wird mit Stickstoff aufgefüllt, der Kolben gewogen und wiederum in den Exsikkator gelegt. Nach einer weiteren 1/2 Std. wird der Kolben wieder gewogen. Wenn das Gewicht konstant bleibt, ist die Substanz trocken und kann weiter verarbeitet werden. Man kann die getrockneten Lipide aber auch einige Tage unter Petroläther aufheben und sie später verarbeiten.

5. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie zur Auftrennung der einzelnen Phospholipide

Die Methode wurde von DEBUCH (10) beschrieben.
Die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie gestattet bei Verwendung sehr kleiner Lipoidmengen eine quantitative Bestimmung der einzelnen Phospholipide. Vor allem bietet sie die Möglichkeit, 1,2 Diacylverbindungen neben 1- oder 2-Monoacylverbindungen getrennt zu erfassen. Wendet man nämlich

die Methode der fraktionierten Hydrolyse nach DAWSON (9) an, so ist es nicht möglich, zwischen den Diacyl- und den sogenannten Lysoverbindungen, die den gleichen stickstoffhaltigen Baustein besitzen, zu unterscheiden.

Außerdem sind die für eine derartige Analyse notwendigen Mengen an Phospholipidgemischen für einige Fragestellungen noch zu groß.

Viel weniger sind säulenchromatographische Auftrennungen von Phospholipidgemischen geeignet, quantitative Angaben über die Verteilung der einzelnen Glycerinphospholipide zu geben. Außerdem ist die Gefahr einer partiellen Veränderung vor allem empfindlicher Phospholipide (z.B. der Plasmalogene), außerordentlich groß (3).

Das Prinzip der Methode beruht auf der Phosphorbestimmung der von der Platte entnommenen Kieselgelschicht. Sie scheint bessere Ergebnisse zu liefern als die Veraschung auf der Platte mit anschließender Densitometrie.

Bei der Anwendung dieser Methode sollte man sich möglichst an alle beschriebenen Einzelheiten halten, um gute Ergebnisse zu erzielen. Prinzipiell werden alle Lösungen mit Aqua bidest angesetzt und alle Glasgeräte in Chromschwefelsäure oder RBS 50 der Firma Roth gewaschen und mit bidestilliertem Wasser nachgespült.

a) Herstellung der Platten

Glasplatten (20 cm x 20 cm) werden in konzentrierter Na_2CO_3-Lösung aufgehoben, um sie zu entfetten, mit Wasser und Aqua bidest gespült und im Trockenschrank getrocknet. 50 g Kieselgel (MN-Kieselgel N-HR/DC, Charge 93, Fa. Mackerey, Nagel & Co., Düren) werden mit 90 bis 95 ml Aqua bidest ca. 7 - 10 min. gut geschüttelt und mit dem Streichgerät (C.Desaga, Heidelberg) in einer Dicke von 300 - 375 µ, nach 20 Sek. Stehenlassen, innerhalb von 12 - 15 Sekunden auf 5 Glasplatten aufgetragen. Die Platten werden eine Stunde an der Luft getrocknet und anschließend 10 min. bei 110°C im Trockenschrank aktiviert. Der Trockenschrank darf nur langsam erhitzt werden, da ansonsten die Kieselgelschicht leicht rissig wird. Die Platten sollten so wenig wie möglich an der Luft liegen, wenngleich unter den hier beschriebenen Bedingungen der Feuchtigkeitsgehalt der Platten nicht standardisiert ist. So findet man auch immer Unterschiede in den Rf-Werten, selbst bei ein und demselben Phosphatid. Da der Feuchtigkeitsgehalt der Kieselgelschicht durch den Feuchtigkeitsgehalt der Luft beim Auftragen der Proben sich verändert, haben wir darauf verzichtet, eine Standardisierung der Feuchtigkeit vorzunehmen. Die fertigen Platten werden lediglich bis zu ihrer Verwendung in einem Exsikkator über Blaugel aufgehoben.

b) Auftragen der Proben

Von dem getrockneten Lipidgemisch werden 6 - 7 mg auf einer vorher gewogenen Glasscherbe mit Hilfe einer Mikrowaage (Fa. Mettler, Giessen, BA 25, BE 22, ME 22) abgewogen. Die Lipide werden mit der Scherbe in ein Schliffstopfenglas gegeben und in 1 ml $CHCL_3$:CH_3OH (2:1)Gemisch gelöst.
Auf 3 Platten werden, 2 cm vom vorderen und unteren Rand entfernt, je 150 µl der gelösten Lipide mit Hilfe einer Hamilton Spritze (500 µl, 750N) und eines Microdosers nach Dibbern (Desaga, Heidelberg) aufgetragen. Diese 15o µl enthalten 9oo -1000 µg Lipidgemisch (etwa 600 µg Phosphor). Man sollte nicht mehr als 1000 µg Lipide auftragen, da die Platte ansonsten überladen ist und man keine gute Auftrennung erhält. Außerdem wird zur kontrollierten Einengung des Lösungsmittels ein kalter Foen auf die Auftragestelle gerichtet, der Durchmesser des aufgetragenen Fleckes sollte so klein wie möglich gehalten werden und 10 mm nicht überschreiten. 2 Platten werden für die quantitative Bestimmung der Phospholipide als Doppelbestimmung angesetzt. Eine 3. Platte wird zur Orientierung über die einzelnen Komponenten mit Ninhydrin-Reagenz (5 g Ninhydrin/Fa. Merck ad 1000 ml Aceton) und anschließend mit Zinzadze-Reagenz besprüht. Um den gesamten Phosphorgehalt des aufgetragenen Lipidgemisches zu bestimmen, werden 3 Proben von 50 µl der gelösten Lipide in Spitzzentrifugengläser pipettiert und am Rotationsverdampfer eingeengt.

c) Entwicklung des Chromatogramms

Laufmittel	I:	$CHCL_3$	130 ml
		CH_3OH	50 ml
		H_2O	8 ml
Laufmittel	II:	$CHCL_3$	130 ml
		CH_3OH	50 ml
		Eisessig	16 ml

Zur Trennung der Phospholipide hat sich das von WAGNER (28) angegebene Fließmittelsystem $CHCL_3$:CH_3OH:H_2O; 65:25:4 (v:v:v) bewährt.

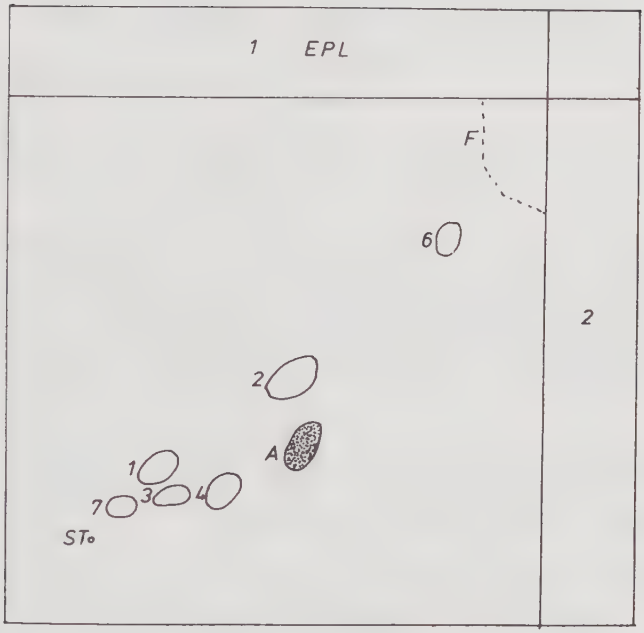
Es wurde als erstes Fließmittel ein neutrales gewählt, um die Plasmalogene möglichst zu schonen und Artefaktbildung zu vermeiden.

Jede der drei Dünnschichtplatten wird ca. 70 - 80 min. senkrecht in eine Chromatographiekammer mit dem Laufmittel I gestellt. Die Laufstrecke beträgt etwa 15 cm. Danach werden die Platten in einem leeren Exsikkator 20 - 30 min. evakuiert. Man sollte die Trocknungszeit von 30 min. nicht überschreiten, da sonst die Gefahr einer Veränderung der Lipide auf der Kieselgelschicht zu groß wird. Nach dem Trocknen wird vorsichtig mit N_2 belüftet.

Die Chromatographieplatten werden in Laufkammern mit dem Fließmittel II gestellt und ebenfalls 70 -80 min. darin belassen. Man trocknet die Platten an der Luft. Falls sie nicht sofort weiterverarbeitet werden, stellt man die Platten in einen zweiten leeren Exsikkator.

Man darf die beiden Exsikkatoren nicht vertauschen, da sich in dem zweiten Exsikkator Spuren von Essigsäure an der Wand befinden können. Stellt man nun die in der 1. Laufrichtung entwickelten Chromatogramme in diesen Exsikkator, so kann es zu einer Hydrolyse der Enoläther-verbindung von Plasmalogenen kommen, so daß sich bei der Entwicklung in der zweiten Richtung Lysophosphatide zeigen.

Chromatographieplatte von gesunden Probanden nach Anfärben mit J_2-Dämpfen



Chromatographieplatte von Probanden nach i.v. Gabe von "EPL"

d) Abnahme der einzelnen Phospholipidkomponenten von der Platte

Die Platte wird zum Sichtbarmachen der Phospholipide kurz in eine Kammer mit J_2-Dämpfen gestellt. Die Flecken werden mit einer Nadel rundherum markiert und die Platte unter einen Foen gelegt bis die Flecken nur noch schwach oder gar nicht mehr zu sehen sind. Danach wird die Platte mit ca. 30 ml Aqua bidest. besprüht. Die Kieselgelschicht muß angefeuchtet werden, um einen Absaugverlust zu vermeiden. Die einzelnen Phospholipidkomponenten werden mit dem Kieselgel an einer Wasserstrahlpumpe bei schwachem Vakuum durch eine Absaugvorrichtung in spitze Schliffzentrifugengläser abgesaugt. In die Zentrifugengläser gibt man vorher o,4 ml 70 %ige Perchlorsäure, um ebenfalls einen Absaugverlust zu vermeiden. Mit 0,3 ml 70 %iger Perchlorsäure werden die Wände der Zentrifugengläser nach dem Absaugen gewaschen.

Der nicht phosphorhaltige Rest der Lipide ist in der Nähe der Front zusammengeschoben.

e) Bestimmung des Phosphorgehalts der einzelnen Komponenten

Herstellung der Reagentien:

0,22 %ige Ammoniummolybdatlösung
(1,1 g Ammoniummolybdat (Fa. Merck)
ad 500 ml Aqua bidest)

täglich neu ansetzen.

Fiske-Subbarow-Reagenz: (13)

6,85 g	$Na_2S_2O_5$	Natriumpyrosulfit (Fa. Merck)
1,5 g	Na_2SO_3	Natriumsulfit (Fa. Merck)
0,125g	$C_{10}HgNO_4S$	1-Amino-2-hydroxy-naphtalin-sulfonsäure-(4) (m) (Fa. Merck)

ad 50 ml Aqua bidest.

(In dunkler Flasche ca. 10 Tage haltbar)

Im Allgemeinen basiert die Phosphorbestimmung auf der Bildung eines Komplexes zwischen Phosphorsäure und Molybdat. Dieser Komplex wird mit 1-amino-2-naphtol-4-Sulfanylsäure reduziert und bildet die bekannte molybdän-blaue Farbe.

Um den Phosphorgehalt der aufgetragenen Lipidlösung zu ermitteln, werden 100 - 130 µg Lipidgemisch in 50 µl $CHCl_3$:CH_3OH (2:1) gelöst und in Schliffzentrifugenläser pipettiert. Das Lösungsmittel verdunstet entweder an der Luft oder wird am Rotavapor bei Zimmertemperatur abgezogen.

Als Blindwert dient ein leeres Schliffzentrifugenglas. Außerdem wird eine Menge Kieselgel, entsprechend der Größe der bereits abgenommenen Flecken, am Rand der Platten abgenommen und als Leerwert bestimmt. Um eine Kontrolle und einen Umrechnungsfaktor für die Phosphorbestimmung zu haben wird zusätzlich eine Testlösung als Standard mitbestimmt.

Etwa 12 mg Dinatriumphenylphosphat p.a. (Fa. Merck) werden in 200 ml aqua bidest gelöst (100 mg Dinatriumphenylphosphat enthalten 12,18 mg Phosphor).

Davon werden je 0,5 ml in zwei Zentrifugengläser pipettiert und das Wasser am Rotavapor abgedampft. Die Extinktionswerte der Testlösung sollen nachher um 0,600 liegen. In alle diese Proben (Blindwert, Leerwert, Standard) werden 0,7 ml Perchlorsäure gegeben und zusammen mit den einzelnen Phospholipidfraktionen der Platten in einem Aluminiumblock 30 min. bei 190°C verascht. Der Block muß langsam angeheizt werden und dann 30 min. bei 190°C belassen werden, da sonst ein Siedeverzug entsteht. Anschließend werden die Gläser herausgenommen und auf Zimmertemperatur abgekühlt.

Man gibt 4,6 ml 0,22 %ige Ammoniummolybdatlösung und 0,2 ml Fiske-Subbarow-Reagenz in die abgekühlten Zentrifugengläser Die Gläser werden mit Schliffstopfen verschlossen, ca. 20 sec. mit dem Vortex-Mixer gut geschüttelt und 10 min. bei 90°C in ein Wasserbad gestellt.

Die Farbe erreicht ihr Maximum 4 - 5 min. nachdem die Lösung 90°C erreicht hat und bleibt konstant für einige Minuten bei weiterem Aufheizen. Die endgültige Farbe ist bei Raumtemperatur ca. 24 Std. stabil (3). Nach dem Aufheizen werden die Gläser in einem kalten Wasserbad abgekühlt, nochmals geschüttelt und 10 min. bei 3000 rpm abzentrifugiert. Die Lösung wird vom Kieselgel dekantiert und photometrisch gemessen.

Die photometrische Bestimmung wurde an einem Spektralphotometer PMQ 2 der Fa. Zeiss, Oberkochen, durchgeführt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur in 10 mm Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von 815 nm vorgenommen.

Die Extinktion des Leerwerts wurde gegen den Blindwert gemessen. Anschließend wurden die Extinktionen der Proben gegen den Leerwert gemessen, um gleich die Eigenextinktion des Kieselgels auszuschließen. Aus den Extinktionen der Proben wurde anschließend die prozentuale Zusammensetzung der Phospholipide errechnet.

Wiederfindungsrate

Während des ganzen Versuches wurden die 3 Reagenzgläser mit jeweils 50 µl eingeengten Gesamtlipiden genauso behandelt wie jede einzelne Phospholipidfraktion.

Die Summe der Extinktionen der Gesamtlipide wird gleich 100 % gesetzt. Aus dem Vergleich der Summe der Extinktionen der Einzelfraktionen ergibt sich die Wiederfindungsrate in %. Sie liegt bei diesen Versuchen zwischen 95 % und 99 %.

f) Identifizierung der Einzelfraktionen

Herstellung der Sprühreagenzien

Ninhydrin-Reagenz: 5g Ninhydrin (Fa. Merck) ad 1000 ml Aceton

Zinzadze-Reagenz (11):

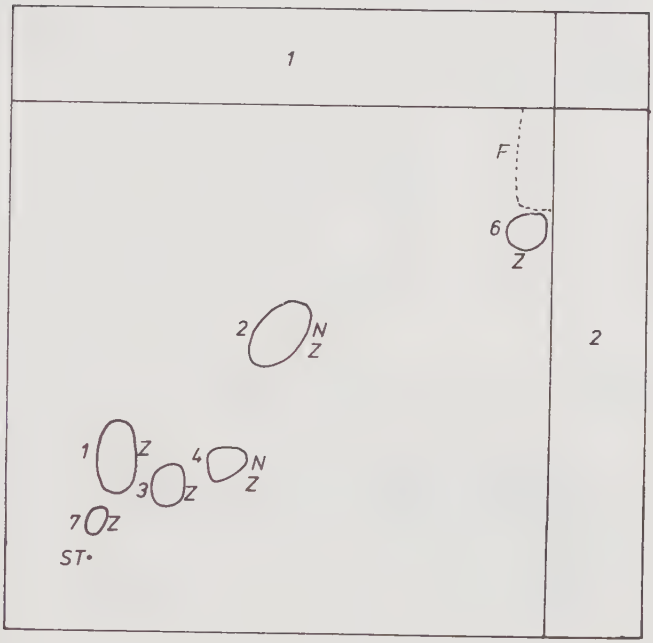
Lösung 1 : 1000 ml 25 NH_2SO_4
+ 305 ml aqua bidest
+40,11 g Ammoniummolybdänoxyd (Fa.Merck)
10 min. kochen

Lösung 2 : 500 ml Lösung 1
+1,78 g Molybdän gepulvert (Fa. Merck)
schwach kochen.
Reagenz: 250 ml Lösung 1 + 250 ml Lösung 2 + 500 ml H_2O

Die Identifizierung der Einzelfraktionen wurde nach DEBUCH (10) und DITTMER (11) vorgenommen.

Ferner wurden zur Identifizierung der Phospholipide auf drei weiteren Chromatographieplatten Gesamtphospholipide von stoffwechselgesunden Patienten, wie in der vorangegangenen Versuchsanordnung beschrieben, aufgetragen. Zusätzlich wurden noch reine Phospholipidsubstanzen, Phosphatidylserin, Sphingomyelin und Phosphatidylinosit, auf die Chromatographieplatten über die Gesamtlipide aufgetragen. Von den reinen Substanzen wurden je 0,1 mg in 1 ml $CHCL_3$:CH_3OH 2:1 gelöst und jede Substanz auf eine andere Chromatographieplatte zusätzlich aufgetragen. Zum Sichtbarmachen der einzelnen Fraktionen wurden die Platten erst mit Ninhydrin-Reagenz besprüht und 10 min. bei 120°C in den Trockenschrank gestellt. Die aminosäurehaltigen Phospholipide färben sich rot. In unserem Fall sind es Phosphatidylserin und Phosphatidyläthanolamin.

Anschließend werden die Platten mit Zinzadze-Reagenz besprüht und 15 min. bei 120°C in den Trockenschrank gestellt. Alle Phospholipide zeigen eine blau-graue Farbe.



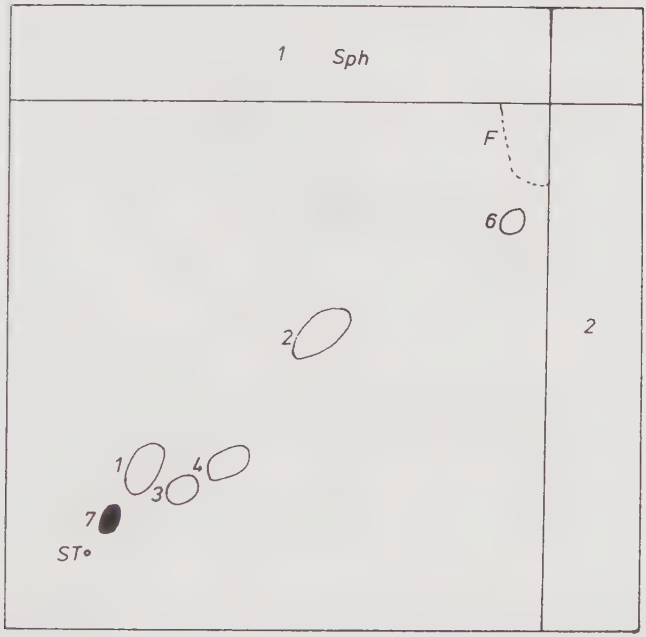
Chromatographieplatte zum qualitativen Nachweis der Phospholipide mit Ninhydrin- und Zinzadze-Reagenz

Die Phospholipidfraktionen, von denen auch noch reine Substanzen aufgetragen wurden, erscheinen deutlich intensiver, so daß eine eindeutige Identifizierung anhand der besprühten Platten erfolgen kann. Zur Identifizierung der einzelnen Phospholipide helfen außerdem die von STAHL (25) angegebenen Rf-Werte:

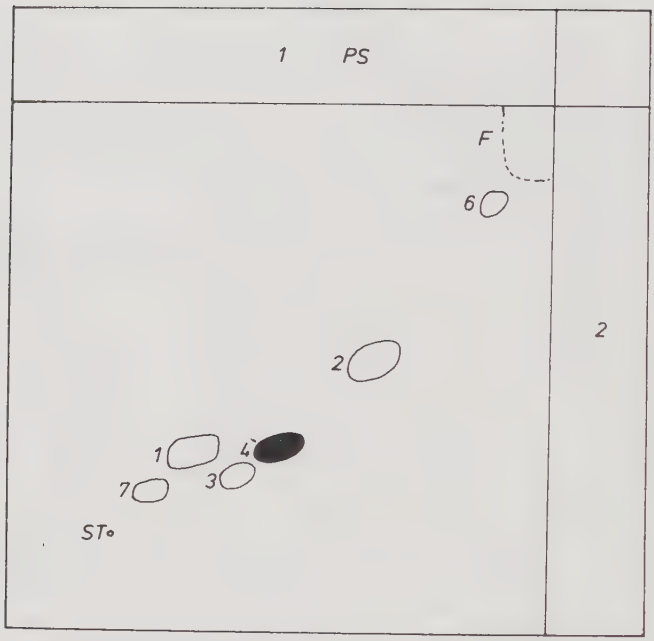
Sph: 29 ± 5,5
PC : 39 ± 5,5
PE : 57 ± 7,5
Cardiolipin: 92 ± 1,5

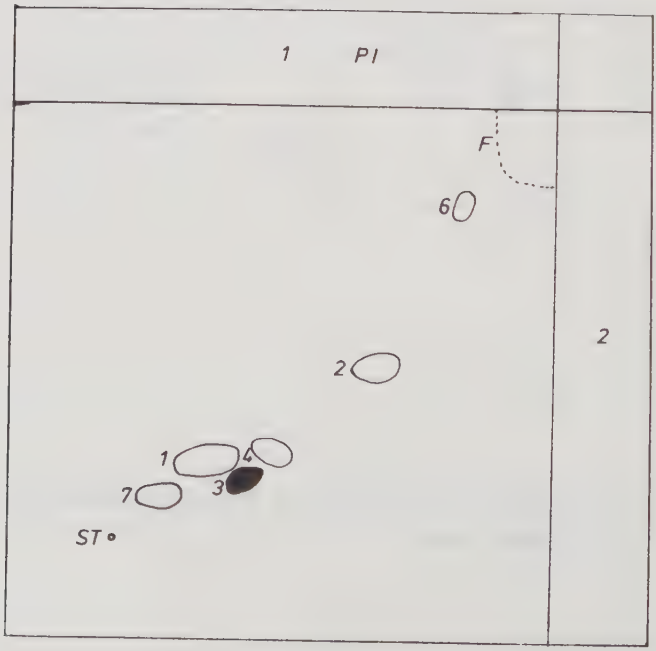
Bezeichnung der einzelnen Phospholipide:

1 : Phosphatidylcholin : PC
2 : Phosphatidyläthanolamin : PE
3 : Phosphatidylinosit : PI
4 : Phosphatidylserin : PS
6 : Cardiolipin
7 : Sphingomyelin : Sph



Chromatographieplatten zur Identifizierung der Einzelfraktionen


1 PS
F
6
2
2
1
4
7
3
ST.


1 PI
F
6
2
2
1
4
7
3
ST.

6. Auswertung und Statistik

Ausgewertet wurden jeweils nur die identifizierten Fraktionen 1, 2, 3, 4 und 7. Startfleck, Frontlinie und der Punkt 6 (Cardiolipin) wurden nur bei der Berechnung der Wiederfindungsrate mitberücksichtigt.

Bei den mit "EPL" gespritzten Patienten zeigte sich außer den oben genannten Fraktionen noch eine zusätzliche Fraktion A. Dieser Fleck A ließ sich zwar mit J_2-Dämpfen anfärben, blieb jedoch bei dem Besprühen mit Zinzadze-Reagenz unsichtbar. Er konnte daher nicht eindeutig als Phospholipid identifiziert werden. Es handelt sich wahrscheinlich um ein Plasmalogen, das sonst in der Front mitläuft und eventuell nach dem Spritzen einen Komplex bildet und daher einen anderen Rf-Wert besitzt Dieser Fleck A wurde bei den Berechnungen nicht mitberücksichtigt.

Die Summe der Extinktionen (E) der einzelnen Phospholipidfraktionen (P) 1,2,3,4 und 7 wurde gleich 100 % gesetzt.

$$E_i = E\ (P)$$

$$E = \sum_{i=1}^{n} E_i = 100\ \%$$

Der prozentuale Anteil der Einzelfraktionen berechnet sich dann wie folgt:

$$E\ (P_i) = \frac{100\ \% \times E_i}{E}$$

Um den Phosphorgehalt der aufgetragenen Probe zu bestimmen, benutzt man das Dinatriumphenylphosphat als Faktor. Der Faktor errechnet sich aus den enthaltenen µg Phosphor in 0,5 ml Aqua bidest und der Extinktion dieser Testprobe:

$$\text{Faktor} = \frac{\mu g\ \text{Phosphor in 0,5 ml Lsg.}}{\text{Ext. Lsg.}}$$

Den Phosphorgehalt der zu bestimmenden Phospholipidfraktionen (Pf) errechnet man wie folgt:

$$\mu g \text{ Phosphor (Pf)} = \text{Faktor} \times \text{Ext. (Pf)}$$

Statistik

Die Membranphospholipide sämtlicher Probanden wurden in Doppelbestimmung analysiert.

In der statistischen Berechnung werden die einzelnen Patientengruppen wegen der Übersichtlichkeit mit folgenden Ziffern benannt:

"Gesunde"	=	Gruppe A	(n=20)
"Zieve"	=	Gruppe B	(n=20)
"Junge"	=	Gruppe C_1	(n=10)
"Junge nach EPL"	=	Gruppe C_2	(n=10)
"Alte"	=	Gruppe D_1	(n=10)
"Alte nach EPL"	=	Gruppe D_2	(n=10)

Der Durchschnittswert sämtlicher Phospholipidfraktionen wird bei allen Gruppen durch das arithmetische Mittel bestimmt:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} x_i$$

Der Mittelwert sagt nichts aus über die Verteilung der Varianten und damit über die Variabilität. Er muß ergänzt werden durch einen Variationswert, der die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert ausdrückt. Die Schwankungsbreite wird ausgedrückt durch die Standardabweichung (s^2):

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})$$

Will man feststellen, ob die Abweichung einer Größe vom Mittelwert erheblich ist, so bestimmt man die Streuung der Mittelwerte (m)

$$m = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Bei unseren Berechnungen wurden folgende Gruppen miteinander verglichen:

1.) A/B
2.) C_1/D_1
3.) C_2/D_2
4.) C_1/C_2
5.) D_1/D_2
6.) C_1+D_1/C_2+D_2

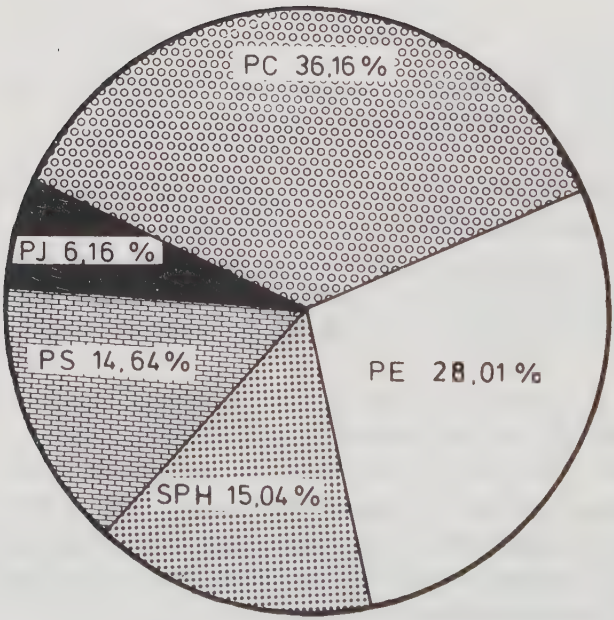
Um zu prüfen, ob die Unterschiede signifikant sind, benutzen wir die sogenannte Nullhypothese.

Diese geht davon aus, daß zwischen den betrachteten Teilgesamtheiten keine echte Differenz vorhanden ist, daß beide verglichenen Stichproben also einer einheitlichen Grundgesamtheit entstammen. Man prüft nun die Wahrscheinlichkeit, die für diese Annahme spricht.

Wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit der Nullhypothese kleiner als 5% ist, können wir die Unterschiede zwischen den beiden Meßreihen als signifikant betrachten. Ist die Irrtumswahrscheinlichkeit größer als 5%, so bedeutet dies nicht, daß kein Unterschied besteht, sondern nur, daß zwischen den Proben keine signifikante Differenz vorliegt.

C. Ergebnisse

Die normale Verteilung der Phospholipide in den Erythrozytenmembranen bei unseren gesunden Probanden ist folgende:



Die Zieve-Syndrom-Patienten zeigen keine deutlichen Unterschiede in der Verteilung der Phospholipide gegenüber den gesunden Probanden. Phosphatidylinosit ist zwar bei den Zieve-Syndrom-Patienten um 1,7 % erniedrigt und Phosphatidyläthanolamin um 2 % erhöht, aber diese Unterschiede weisen keine Signifikanz auf.

Unsere jungen und gesunden älteren Probanden stimmen in der Phospholipidverteilung vor der i.v. Gabe von "hochungesättigten" Phospholipiden nahezu überein. Phosphatidylserin ist bei den älteren Probanden um 2,5 % erniedrigt und Phosphatidyläthanolamin um 3,3 % erhöht. Auch diese Unterschiede sind nicht signifikant.

Nach der i.v. Gabe von "hochungesättigten" Phospholipiden finden wir ebenfalls keine Signifikanten Unterschiede zwischen jungen und älteren Probanden.

Die jungen Probanden vor und nach i.v. Gabe von"EPL" zeigen einen Trend zur Verminderung von Sphingomyelin. Vor dem Spritzen betrug das Sphingomyelin 14,6 % und nachher nur noch 7,3 %.

Bei den älteren Probanden finden wir zwei signifikante Veränderungen der Phospholipidverteilung: Das Sphingomyelin ist von 15,5 % auf 6,7 % gefallen und Phosphatidylserin von 13,4 % auf 17,6 % gestiegen.

Alle Probanden weisen vor und nach der i.v. Injektion eine signifikante Erniedrigung des Sphingomyelins von 15,0 % auf 7,0 % auf.

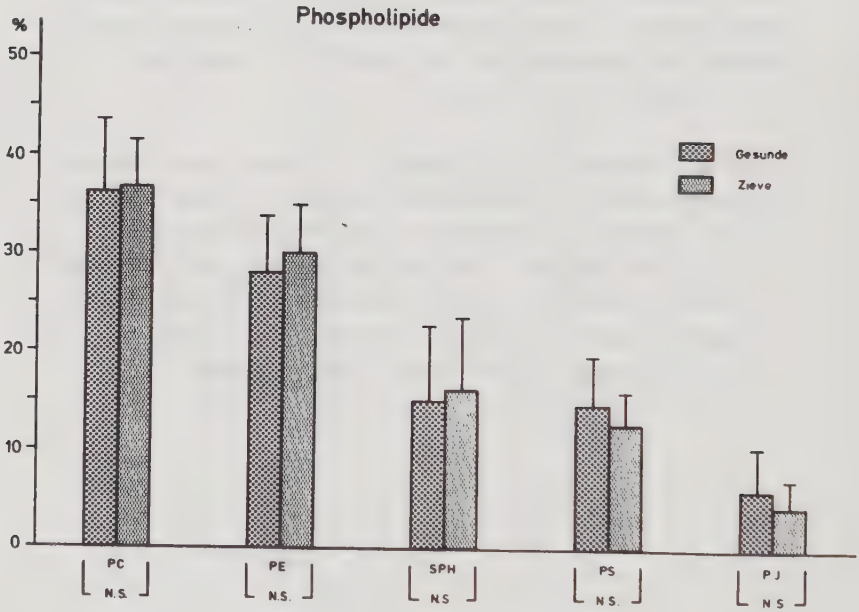
Die Phospholipidfraktionen der einzelnen Gruppen sind noch einmal in einer Tabelle zusammengefaßt:

	Fraktion	%
A	PC	36,16
	SPH	15,04
	PE	28,01
	PI	6,16
	PS	14,64
B	PC	36,53
	SPH	16,22
	PE	30,06
	PI	4,48
	PS	12,71
C_1	PC	36,34
	SPH	14,61
	PE	26,82
	PI	6,33
	PS	15,90
C_2	PC	42,28
	SPH	7,32
	PE	28,29
	PI	6,92
	PS	14,94
D_1	PC	35,97
	SPH	15,46
	PE	29,19
	PI	5,99
	PS	13,38
D_2	PC	37,35
	SPH	6,66
	PE	27,24
	PI	8,15
	PS	17,60
C_1+D_1	PC	36,16
	SPH	15,04
	PE	28,01
	PI	6,16
	PS	14,64
C_2+D_2	PC	39,81
	SPH	6,99
	PE	27,77
	PI	7,53
	PS	16,27

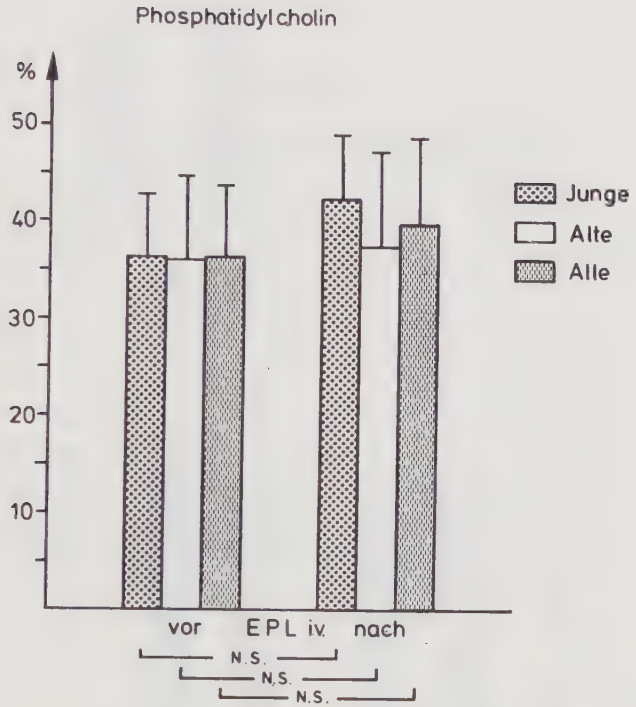
Beim Vergleich der Phospholipidfraktionen der Gruppen A und B wird kein signifikanter Unterschied festgestellt. Ebenso beim Vergleich der Gruppen C_1/D_1 und C_2/D_2.

Beim Vergleich der Gruppe C_1 mit C_2 ist zwar keine Signifikanz, aber immerhin ein Trend beim Sphingomyelin zu erkennen. Es ist nach i.v. Gabe von "EPL" deutlich erniedrigt.

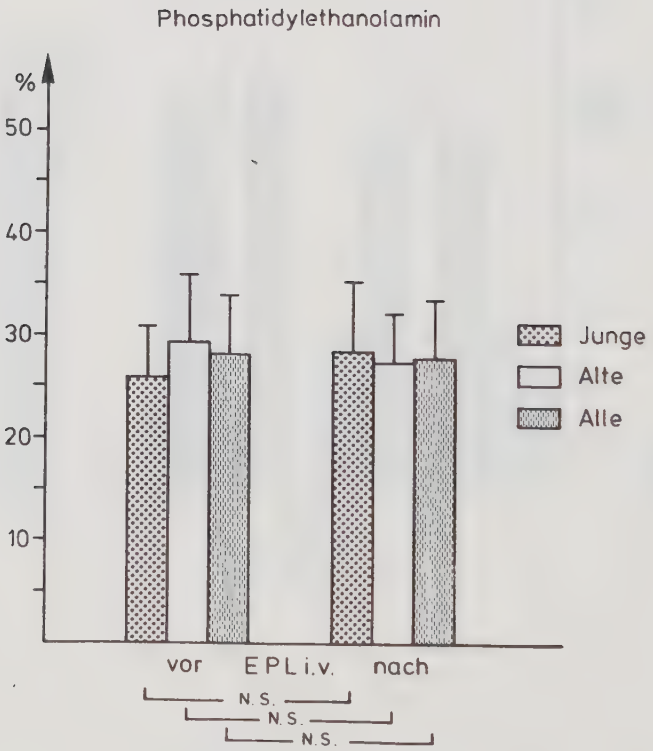
Bei den Gruppen D_1/D_2 zeigen sich zwei signifikante Unterschiede. Sphingomyelin ist wie bei den "Jungen" stark erniedrigt. Außerdem ist Phosphatidylserin signifikant erhöht. Vergleichen wir nun alle Patienten ("Junge + Alte") vor i.v. Gabe von "EPL" mit allen Patienten nach i.v. Gabe von "EPL", so zeigt sich nur beim Sphingomyelin der signifikante Abfall dieser Fraktion.



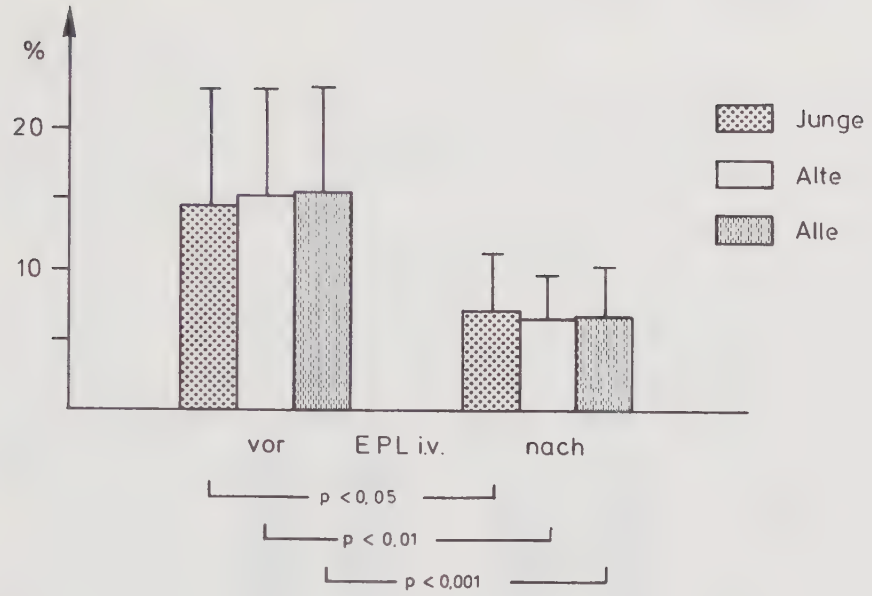
Phospholipidgehalt bei Zieve- und gesunden Patienten



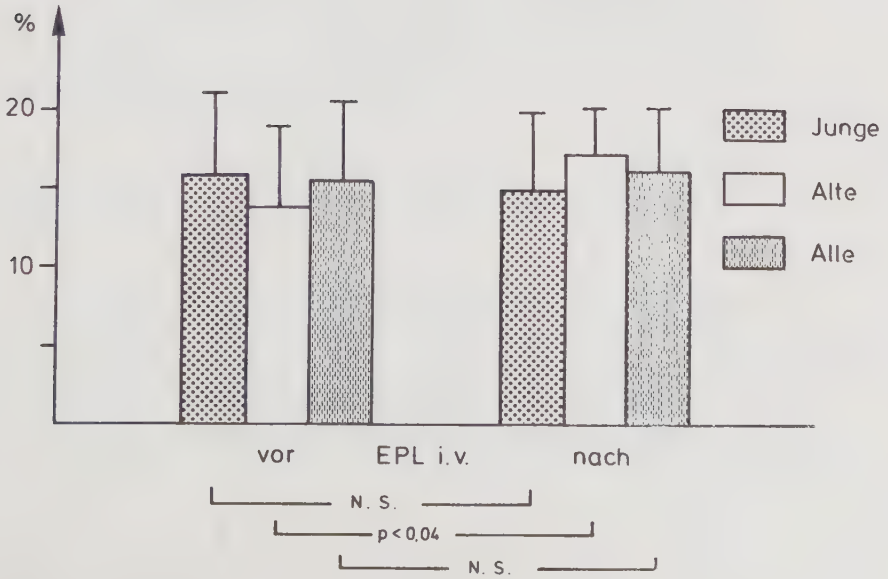
Phospholipide bei Probanden vor und nach i.v. Gabe von "EPL".

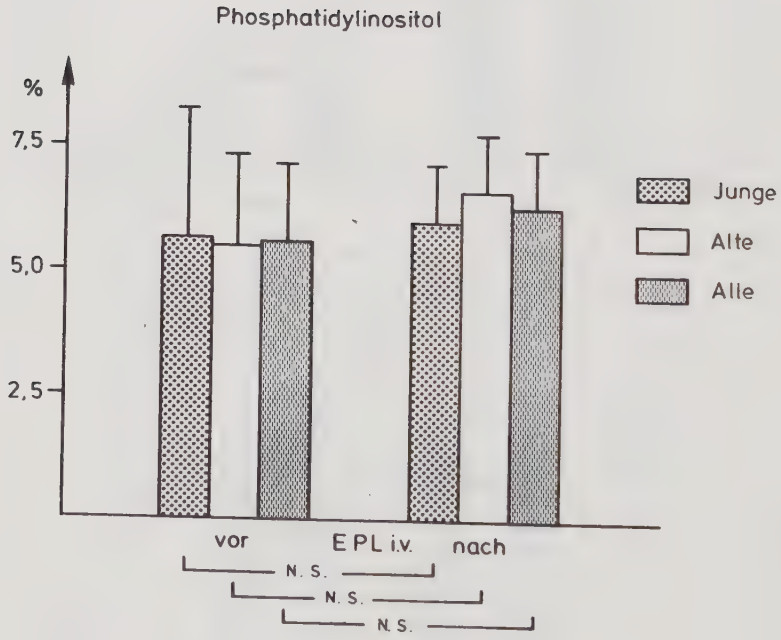

Phosphatidylethanolamin
%
50
40
30
20
10
Junge
Alte
Alle
vor EPL i.v. nach
N.S.
N.S.
N.S.

Sphingomyelin



Phosphatidylserin




Phosphatidylinositol
%
7,5
5,0
2,5
Junge
Alte
Alle
vor
E PL i.v.
nach
N. S.
N. S.
N. S.

D. Diskussion

Die experimentellen Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen keine Unterschiede im Phospholipidmuster der Erythrozytenmembranen zwischen Zieve-Syndrom-Patienten und Stoffwechselgesunden auf.

Bei verschiedenen Lebererkrankungen fand man im Plasma unterschiedliche Phospholipidmuster. Die Fettleber weist eine Erhöhung des Phosphatidyläthanolamins auf; bei der Lebercirrhose ist zusätzlich noch Lysolecithin erhöht. Bei der Hepatitis fand man Erhöhungen des Sphingomyelins. Phosphatidylcholins und Phosphatidyläthanolamins, wohingegen Lysolecithin erniedrigt war (19).

Bei Zieve-Syndrom-Patienten in der Remission waren in Erythrozytenmembranen Erniedrigungen der Werte für Sphingomyelin und Phosphatidyläthanolamin festgestellt worden (17).

Da bei diesen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede gefunden worden sind, kann angenommen werden, daß das jeweilige klinische Stadium (Schub, Remission) der Erkrankung einen gewissen Einfluß auf die aktuellen Phospholipidkonzentrationen hat.

Bei der i.v. Gabe von hochungesättigten Phospholipiden (EPL) fanden wir signifikante Unterschiede bei den Probanden vor und nach Gabe von "EPL".

"EPL" wird Patienten mit Fettembolie und als Adjuvans bei Patienten mit Hyperlipämie gegeben, um die Gesamtlipide und das Cholesterin zu senken. Außerdem beeinflußt es möglicherweise periphere und coronare Durchblutungsstörungen über Veränderung der Thrombozyten-

adhäsivität (23).

Über die Abhängigkeit der Erythrozytenflexibilität bzw. Fluidität von Sphingomyelin und Phosphatidylcholin liegen neuere Ergebnisse aus in vitro Untersuchungen vor:

BOROCHOV untersuchte den Phosphatidylcholineinbau bei Schafserythrozyten in vitro unter Anwesenheit von Ca^{++}. Bei ganzen Zellen wurde kein Phosphatidylcholin eingebaut, da vermutlich die an den Membranaußenwänden befindliche Ca^{++} abhängige Lecithinase Phosphatidylcholin abbaut. In Membranen von destruierten Zellen wurde trotz Ca^{++}-Anwesenheit Phosphatidylcholin eingebaut. Man fand heraus, daß dadurch der Quotient von Phosphatidylcholin/Sphingomyelin stieg. Dadurch bedingt stieg ebenfalls die Fluidität der Erythrozyten aber auch die osmotische Fragilität (5).

In unseren in vivo Untersuchungen an gesunden Probanden fanden wir eine starke Erniedrigung des Sphingomyelins nach i.v. Gabe von "EPL" und eine geringere Erhöhung des Phosphatidylcholins, d.h. der Schutz gegen den Phospholipidaustausch beim intakten Erythrozyten durch die Lecithinase muß weniger angelegt oder gar nicht vorhanden sein. Durch den erhöhten Quotient von Phosphatidylcholin/Sphingomyelin ist es denkbar, daß die Fluidität der Erythrozyten zunimmt, ein wünschenswerter Effekt bei Durchblutungsstörungen aller Art. Die erhöhte osmotische Fragilität bei Schafserythrozyten durch Erhöhung dieses Quotienten wäre auf den Menschen übertragen eine ungünstige Nebenwirkung, insbesondere bei Hämolysen, bedingt oder mitbedingt durch Membranstörungen.

E. Zusammenfassung

Es wurden Erythrozytenmembranphospholipide (Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinosit, Sphingomyelin) von 20 Stoffwechslgesunden und von 20 Zieve-Syndrom-Patienten untersucht. Dazu wurden die einzelnen Phospholipidfraktionen dünnschichtchromatographisch und photometrisch bestimmt Der Vergleich der beiden Patientengruppen ergab keine signifikanten Unterschiede im Phospholipidmuster.

Außerdem wurden 10 gesunden, freiwilligen Personen im Alter von 24 - 28 Jahren und 10 Probanden im Alter von 61 - 83 Jahren "hochungesättigte" Phospholipide (EPL) i.v. verabfolgt. Auch bei diesen Personen bestimmten wir die Phospholipide der Erythrozytenmembranen.

Beim Vergleich der behandelten mit den unbehandelten Probanden ergab sich eine signifikante Erniedrigung des Sphingomyelins. Zusätzlich fand man bei den älteren Personen eine signifikante Erhöhung des Phosphatidylserins.

Literaturverzeichnis

1. ANSELSTETTER, V.

   Gel Elektrophoresis of the Human Erythrocyte Membrane Proteins: Aberrant Patterns in Hematological and Non-hematological Diseases

   Blut
   36: 135 (1978)

2. ASSHOFF, H.

   Zu seltene Diagnose: Zieve-Syndrom

   Med. Klinik
   68: 149 (1973)

3. BARTLETT, G.R.

   Phosphorus Assay in Column Chromatography

   Journ. biol. Chem.
   234: 466 (1959)

4. BEGEMANN, H.

   Klinische Hämatologie

   Thieme Verlag (1970)

5. BOROCHOV, H., ZAHLER, P., WILBRANDT, W., SHINITZKY, M.

   The Effect of Phosphatidylcholine to Sphingomyelin mole Ratio on the Dynamic Properties of Sheep Erythrocyte Membrane

   Biochim. et Biophys. Acta
   470: 382 (1977)

6. BUSCH, D., PELZ, K.

   Erythrozytenisolierung aus Blut mit Baumwolle

   Klin. Wochenschr.
   16: 983 (1966)

7. CANTONI, L., CURRI, S.B., ANDREUZZI, P. ROCCHETTI, P.

Plasma and Red Blood Cell Phospholipids in Chronic Liver Diseases

Clin. Chim. Acta
60: 405 (1975)

8. CHAPMAN, D.

Lipide

Hippokrates Verlag (1973)

9. DAWSON, R.M.C.

The Hydrolytic Procedure for the Identification and Estimation of Individual Phospholipids in Biological Sample

Biochem. Journ.
75: 45 (1960)

10. DEBUCH, H., MERTENS, W., WINTERFELD, M.

Quantitative Bestimmung der Phosphatide mit Hilfe einer zweidimensionalen dünnschicht-chromatographischen Methode

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
349: 896 (1968)

11. DITTMER, J.C., LESTER, R.L.

A Simple, Specific Spray for the Detection of Phospholipids on Thin-layer Chromatograms

Journ. Lip. Res.
5: 126 (1964)

12. DODGE, J.T., MITCHEL, C., HANAHAN, D.

The Preparation and Chemical Characteristics of Hemoglobin-free Ghosts of Human Erythrocytes

Arch. Biochem. Biophys.
100: 119 (1963)

13. FISKE , C.H., SUBBAROW, Y.

The Colorimetric Determination of Phosphorus

Journ. of Biol. Chem.
66: 375 (1925)

14. FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLEY, D.H.

A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues

Journ. of Biol. Chem.
226: 497 (1957)

15. GOEBEL, K.M., GOEBEL, F.D., MÜHLFELLNER, G., KAFFARNIK, H.

Red Cell Metabolism in Transient Hemolytic Anaemia associated with Zieve's Syndrome

European Journ: of Clin. Invest.
34: 83 (1975)

16. GOEBEL, K.M., GOEBEL, F.D., SCHUBOTZ, R., SCHNEIDER, J.

Red Cell Metabolic and Membrane Features in Hemolytic Anaemia of Alcoholic Liver Disease (Zieve's-Syndrome)

Brit. Journ. of Haemat.
35: 573 (1977)

17. GÜLDENSTERN, W.

Erythrozytenlipide bei Stoffwechselgesunden und Patienten mit Zieve-Syndrom im Hämolyseschub und in der Remission

Inaugural-Dissertation (1977) Marburg

18. HECK, J., KEITEL, K., GEHRMANN, G.

Zwischenbilanz des Zieve-Syndroms

Dtsch. Med. Wschr.
95: 2058 (1970)

19. JIPP, P.

Plasmaphosphatidmuster bei akuten und chronischen Lebererkrankungen

Klin. Wochenschr.
52: 759 (1974)

20. MARTINI, G.A., DÖLLE, W.

Krankheitsbilder bei Leberschädigung durch Alkohol

Dtsch. Med. Wschr.
90: 793 (1965)

21. PRISTAUTZ, H.

Zum therapeutischen Wert der essentiellen Phospholipide
Münch. Med. Wschr.
117: 583 (1975)

22. SCHETTLER, G.

Phospholipide

Thieme Verlag (1972)

23. SCHNEIDER, J., FUCHS, G., KAFFARNIK, H.

Influence of Essential Phospholipds on Human Platelet Aggregability

in Phosphatidylcholine S. 244
H. Peeters, Ed., Springer Verlag (1976)

24. SPERRY, W.M.

The Determination of Total Lipids in Blood Serum

Journ. of Biol. Chem.
213: 69 (1955)

25. STAHL, E.

Dünnschichtchromatographie

Springer Verlag (1967)

26. STRAUB, P.W.

Alkoholwirkung auf das Blut

Schweiz. Med. Wschr.
105: 1072 (1975)

27. THALER, H.

Alkohol und Leberschaden

Dtsch. Med. Wschr.
94: 1213 (1975)

28. WAGNER, H.

Neuere Ergebnisse auf dem Gebiet der Isolierung und Analytik von Phosphatiden und Glykolipiden

Fette, Seifen, Anstrichmittel
62: 1115 (1960)

29. ZIEVE, L.

Jaundice, Hyperlipemia and Hemolytic Anaemia: A heretofore unrecognized Syndrome associated with Alcoholic Fatty Liver and Cirrhosis

Annuals of Inter. Med.
48: 471 (1958)

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Aurich, Aziz, Babel, Bäßler, Berndt, Bode, Braun, Clerk, Dehnicke, Doss, Fischer, Follmann, Försterling, Gradmann, Haberich, Henssen, Ihm, Kadenbach, Kaffarnik, Karlson, Kessel, Kindl, Kirchner, Koecke, Koolman, Koransky, Kraft, Kriegelstein, Krüger, Lenski, Lorenz, Maier, Mannheim, Müller, Nultsch, Peter, Pfeil, Remane, Richter, Rieken, Scheller, Schiff, Schmidt, Schneider, Schönbohm, Seitz, Siegert, Stock, Zickendraht.

Lebenslauf

Am 23. April 1951 wurde ich als Tochter des Zahnarztes Oskar Lorra und seiner Ehefrau Luise, geb. Henze, in Gelsenkirchen geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Commenius Volksschule in Gelsenkirchen. Von 1961 bis 1970 besuchte ich das neusprachliche Ricarda-Huch-Gymnasium in Gelsenkirchen und erhielt am 16. Juni 1970 das Zeugnis der Reife.

Im Wintersemester 1970/71 begann ich mein Studium an der Philipps-Universität Marburg. Nach einsemestrigem Studium der Physik studierte ich ab Sommersemester 1971 Biologie, wo ich mein Vordiplom am 4. Februar 1974 bestand. Nach dem Vordiplom in Biologie studierte ich bis zum Wintersemester 1975/76 Humanbiologie. Am 15. Februar 1976 habe ich das Humanbiologiestudium abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. H. Kaffarnik möchte ich besonderen Dank aussprechen für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg sowie für die Überlassung des Themas.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. J. Schneider für seine freundliche Unterstützung und hilfreichen Hinweise zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Diplom-Mathematiker P. Zöfel vom Rechenzentrum der Universität danke ich für die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Für ihre hilfreiche Unterstützung möchte ich der Technischen Gehilfin Christa Kustosch danken.

Vielen Dank auch allen anderen, die mit Gesprächen und Taten einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.